白及小分子热激蛋白 *BsHsp17.3* 基因的克隆与表达分析

江爱明[1]，蔡高磊[2]，曹 俊[1]，周向宇[1]，柯尊伟[1*]

（1. 汉江师范学院，湖北 十堰 442000；2. 十堰市农业科学院，湖北 十堰 442000）

摘 要：该研究采用同源克隆和 3

RACE 技术，从白及（*Bletilla striata*）中获得与热激蛋白合成有关的 *BsHsp17.3* 基因，并分析 *BsHsp17.3* 基因对不同胁迫的响应，探索人工栽培白及的适宜条件。结果表明：*BsHsp17.3* 基因开放阅读框长度为 453 bp，编码 150 个氨基酸；蛋白的分子量为 17.42 kD，等电点为 6.33；进化树分析表明，BsHSP17.3 蛋白与同为兰科的铁皮石斛进化关系较近，同在一分支上。半定量 RT-PCR 分析显示，*BsHsp17.3* 基因在白及根、叶、鳞茎及花组织中的表达具有特异性，且 *BsHsp17.3* 基因在叶中的表达量较高，在鳞茎及花中不表达。实时荧光定量 PCR 检测显示，*BsHsp17.3* 对非生物胁迫高温、低温具有明显应答反应，20%PEG 模拟干旱胁迫不诱导该基因表达，推测该基因在白及防止倒苗过程中可能发挥一定作用。

关键词：白及，*BsHsp17.3*，克隆，荧光定量 PCR

DOI：10.11931/guihaia.gxzw201711034

Cloning and expression analysis of small heat shock protein gene *BsHsp17.3* in *Bletilla striata*

JIANG Aiming[1], CAI Gaolei[2], CAO Jun[1], ZHOU Xiangyu[1], KE Zunwei[1*]

(1 . *Hanjiang Normal University*, Shiyan 442000, Hubei , China ; 2 . *Shiyan Academy of Agricultural Science*,Shiyan 442000, Hubei , China)

Abstract:.The *BsHsp17.3* gene was isolated from *Bletilla striata* L .using homologous cloning and 3

RACE methods.In this paper, the expression profiles of *BsHsp17.3* under different stresses have been analyzed and explore suitable conditions for artificial cultivation of *B. striata* .The results showed as follows：The opening reading frame of *BsHsp17.3was*453bp， which encoded a 150-amino acid peptide.Its protein molecular weight and isoelectric point were 17.42 kD and 6.33.Phylogenetic analysis demonstrated that BsHsp17.3 is closed to the Hsp17.3 from *Dendrobium catenatum*. Quantitative real-time PCR analysis showed that the expression of BsHsp17.3 was different in leaf, root, bulb and flower of B. striata .The expression level of BsHsp17.3 gene was the highest in leaf and root, respectively, but was absent from the bulb and flower. The expression of BsHsp17.3 was analyzed by quantity RT-PCR under cold, hot and drought treatments.The results showed that the expression of BsHsp17.3 quickly induced by high temperature and cold, but drought stress simulated by 20% PEG did not regulate the gene expression .These results suggested that BsHsp17.3 might be involved in regulating sprout tumble of *Bletilla striata* .

Key words: *Bletilla striata* , BsHsp17.3, clone, quantity RT-PCR

白及（*Bletilla striata*），为多年生草本球根植物，植株高 18~60 cm，叶呈狭长圆形或披针形，花大色艳，种子极细小，似粉末，没有胚乳。假鳞茎扁球形，肥厚肉质，数个相接可入药，有收敛止血、清热解毒、消肿生肌之功效，具有较高的药用价值和观赏价值。白及耐阴惧晒，常生长于较湿润的石壁、苔藓层中，与灌木相结合。每年 6—9 月、12 月至次年 1 月，温度较高和较低，白及地上部分植株枯萎、倒伏，进行倒苗，这是白及抵御高温和低温一种适应性表现。但是倒苗缩短了白及的生长期，严重影响了白及的产量，因此防倒苗是一项非常重要的增产措施（Li et al，2016）。

*收稿日期：2017-11-23

基金项目：湖北省教育厅科研项目（Q20156001）［Supported by Educational Commission of Hubei Province of China（Q20156001）］。

作者简介：江爱明（1982-），男，讲师，主要从事药用植物育种研究，（E-mail）jiangaiming2003@126.com。

*通信作者：柯尊伟，讲师，博士研究生，研究方向为分子遗传学，（E-mail）296942365@qq.com）。

在高温胁迫下，植物细胞中的各种酶因变性丧失功能。为了消除高温胁迫所造成的伤害，植物细胞内具有对损伤蛋白进行修复和清除的机制（Bouchard，1990；Guo et al，2015）。其中，□激蛋白(heat shock protein，HSP)是细胞在高温胁迫下产生的一类蛋白质，它主要作为分子伴侣，辅助蛋白质正确折叠和运输，维持蛋白的构象和功能稳定（Pegoraro et al，2011；Sarkar et al，2009）。根据分子量大小可将植物热激蛋白分成HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小分子量热激蛋白。小分子热激蛋白的分子量在 12~45 kD 之间，也是保守性最低的一类热激蛋白（Sun et al，2001，2002；Yang et al，2017）。研究发现小分子热激蛋白基因在种子发育过程中受高温和渗透胁迫诱导表达，超表达该基因能增强植物对干旱、高温、盐和 UV-B 的抗性（Sun et al，2001；Zou et al，2012；Sun，et al，2015）。

本研究以湖北省十堰市野生白及为研究对象，克隆小分子热激蛋白基因 *BsHsp17.3*，并对其组织特异性及生长过程中主要面临的 3 种不同胁迫条件进行处理，通过实时荧光定量 PCR 检测该基因的表达情况，为白及人工栽培温度调控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

野生白及种子采自湖北省十堰市境内，地理位置为 110°85

E，32°97

N，海拔 315.6 ~ 352.2 m，将采集的新鲜种子消毒灭菌后直播于培养基上进行萌发，将 5 月龄白及植株驯化移栽于汉江师范学院生化系人工气候室。

1.2 方法

1.2.1 白及逆境胁迫处理

对5 叶龄白及植株分别进行 0℃、35℃、20%PEG 模拟干旱胁迫处理 0 h、0.5 h、2 h、8 h、12 h，胁迫处理结束后取植株的完全展开叶片，于液氮中保存，用于基因表达特性分析。

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 合成

剪取生长健康的叶片用于叶片总 RNA 提取（TRIzol 法），反转录成 cDNA，用于克隆 *BsHsp17.3* 基因。

1.2.3 *BsHsp17.3* 基因的克隆

根据 NCBI 数据库中已公布的烟草 *Hsp17.3* 基因（LOC107832104）序列设计上游引物 Hsp17.3-F 和下游引物 Hsp17.3-R，以□ RNA 为模板，按照 PrimeScript™ Double Strand cDNA Synthesis Kit（TaKaRa Code No.6111A））的操作说明合成 cDNA。PCR 反应体系为 20 μL，包括 1 μL cDNA 模板，0.2 μL*Pyrobest* DNA Polymerase，F Primer（20$\mu mol \cdot L^{-1}$）0.15 μL，R Primer（20$\mu mol \cdot L^{-1}$）0.15 μL，10×Pyrobest Buffer II 2 μL，dNTP Mixture 0.2 μL，dH_2O 16.3μL。反应程序为 98℃预变性 2 min，30 个循环（98℃ 10 sec，60℃ 15 sec，68℃ 30 sec），扩增产物回收后测序。

采用 3

-full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒（TaKaRa Code No.6106），利用 3

RACE Outer Primer 和 3

RACE Inner Primer 扩增出完整的 *BsHsp17.3* 基因。用含有 Gold view 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物。回收后的 PCR 产物连接到 pMD™18-T 载体上，委托 Takara 进行 DNA 测序。所用引物见表 1。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer name and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences
Hsp17.3-F	5 GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG 3
Hsp17.3-R	5 CGCTACGTAACGGCATGACAGTG 3
3 RACE Outer Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3 RACE Inner Primer	CGCGGATCCACTAGTGATTTCACTATAGG
QBsHsp17.3F	5 TACGAGCTTCTTCGGCAACC 3
QBsHsp17.3R	5 CCACATTCCTCTCTCCGCTG 3
QBs28sRNA-F	5 TACTGGCTAATACGATCCGG 3
QBs28sRNA-R	5 CCGTTAGATCCTGTACTAACC 3

1.2.2 *BsHsp17.3* 基因的序列比对及系统发育分析

采用 BioXM2.6 软件对 *BsHsp17.3* 基因的可阅读框长度进行预测，并翻译成对应的氨基酸序列；用在线软件 SWISS-MODEL 分析蛋白质相对分子量、等电点和结构域；利用 NCBI 数据库中的 BLAST 进行同源序列分析；采用 DNAMAN 软件对 BsHSP17.3 氨基酸序列进行多重比对；选取来源于 19 个不同植物的 HSP17.3 蛋白（表 2），采用 MEGA5 软件的邻接法（NJ）构建蛋白质序列系统发育树，并编辑成图。

1.2.3 *BsHsp17.3* 基因组织特异表达分析

利用 Trizol 法分别提取白及的根、鳞茎、叶、花组织总 RNA，并反转录成 cDNA，方法见 *BsHsp17.3* 基因的克隆。以白及 28sRNA（GeneBank 登录号：NC_028422.1）为内参基因，内参基因引物为 QBs28sRNA-F 和 QBs28sRNA-

R。利用 Hsp17.3-F 和 Hsp17.3-R 对不同的样品进行半定量 RT-PCR 扩增，分析该基因在不同组织中的表达情况。

1.2.4 *BsHsp17.3* 基因在不同胁迫条件下的表达情况分析

实时荧光定量 PCR 采用 SYBR® Premix *Ex Taq*™试剂盒（TaKaRa），相对定量使用参照基因的$\triangle C_T$，$\triangle C_T=C_{T\,目标基因}$

C_{T28s}。根据克隆到的 *BsHsp17.3* 基因序列设计荧光定量检测引物 QBsHsp17.3F 和 QBsHsp17.3R（表 1），以白及 28sRNA 为内参基因，内参基因引物为QBs28sRNA-F 和 QBs28sRNA-R。qRT-PCR 扩增体系、扩增程序参照试剂盒说明书进行。将生长良好的白及幼苗分别置于 0℃、35℃、20%PEG 模拟干旱胁迫处理 0 h、0.5 h、2 h、8 h、12 h。分别提取上述叶片的总 RNA，采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *BsHsp17.3* 基因在不同胁迫处理下的相对表达量，每份样品 3 次重复，数据通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析。数据统计分析采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 20.0 软件。

表 2 构建分子系统发育树的 HSP17.3 同源蛋白

Table 2 HSP17.3 homologous proteins for phylogenetic tree construction

蛋白质 Protein	种名 Species	登录号 Accession No.
CacaHSP17.3	树豆 *Cajanus cajan*	XP_020239819
RicoHSP17.3	蓖麻 *Ricinus communis*	XP_002520483
GoarHSP17.3	亚洲棉 *Gossypium arboreum*	XP_017639386
GlmaHSP17.3	大豆 *Glycine max*	NP_001235293
JacuHSP-2	麻风树 *Jatropha curcas*	NP_001295687
CusaHSP17.3	黄瓜 *Cucumis sativus*	XP_004150236.2
GohiHSP17.3	陆地棉 *Gossypium hirsutum*	XP_016750638
NiatHSP17.3	野生烟草 *Nicotiana attenuata*	XP_019257984.1
CaanHSP17.3	辣椒 *Capsicum annuum*	XP_016563711.1
NitaHSP17.3	烟草 *Nicotiana tabacum*	XP_016515403.1
ArduHSP17.3	蔓花生 *Arachis duranensis*	XP_015956437.1
PoeuHSP17.3	胡杨*Populus euphratica*	XP_011032205
MuacHSP17.3	小果野蕉 *Musa acuminata*	XP_009416183.1
PheqHSP17.3	蝴蝶兰*Phalaenopsis equestris*	XP_020581392.1
DecaHSP17.3	铁皮石斛 *Dendrobium catenatum*	XP_020678819.1
SeinHSP17.3	胡麻 *Sesamum indicum*	XP_011091949.1
MaesHSP17.3	木薯 *Manihot esculenta*	XP_021634777.1
HeanHSP17.3	向日葵 *Helianthus annuus*	XP_022026022.1

2 结果与分析

2.1 *BsHsp17.3* 基因的克隆与序列分析

本实验采用 RACE 技术，从白及叶片中得到一条约 500 bp 的扩增产物（图 1），将克隆得到的目的条带进行测序。测序结果显示目的基因长度为 527 bp，通过分析显示该基因的开放阅读框为 453 bp，可编码 150 个氨基酸，将其命名为*BsHsp17.3*。为了了解 BsHsp17.3 蛋白的生物学活性及潜在功能，利用在线软件 SWISS-MODEL 对BsHSP17.3 蛋白的理化性质和结构域进行分析和预测，结

果显示：BsHsp17.3 蛋白的分子量为17.42 kD，等电点为6.33。该蛋白含有热休克 ACD 核心区域，一段是 Pro-X（14）-Gly-Val-Leu，另一段是 Pro-X（13）-Val/Leu 序列，中间被亲水的片段隔开（图 2）。将获得的 *BsHsp17.3* 翻译成氨基酸序列进行 Blast 搜索，结果发现，该蛋白与铁皮石斛（*Dendrobium catenatum* L.）HSP17.3（登录号：XP_020678819.1）蛋白具有 54%的相似性；与亚洲棉（*Gossypium arboreum*）HSP17.3（登录号：XP_017639609） 蛋白具有 49%的相似性；与蓖麻（*Ricinus communis*）HSP17.3 (登录号：XP_002520483)蛋白具有 48%的相似性（图3）。

图1 白及 *BsHsp17.3* cDNA 扩增

Fig.1PCR amplification of *BsHsp17.3*cDNA fragment in *B.striata*

注：方框表示 HSP17.3 的两个 ACD 核心区域。
Note：Boxes represent the two ACD domains of HSP17.3.

图2 *BsHsp17.3* 基因的核酸序列和氨基酸序列
Fig.2 Nucleic acid and amino acid sequences of *BsHsp17.3*

图3 BsHsp17.3 蛋白与铁皮石斛、蓖麻、亚洲棉 Hsp17.3 蛋白氨基酸序列的比对
Fig.3 Sequence alignments of the Hsp17.3 protein in B.striata with the Hsp17.3 protein in *D. catenatum*，*R.communis* and *G. arboreum*

2.2HSP17.3 的分子系统发育分析

为了进一步研究 HSP17.3 的进化关系，将 BsHSP17.3 氨基酸序列与其它 18 种植物的 HSP17.3 氨基酸构建系统进化树（图 4）。结果表明：同为兰科的铁皮石斛、蝴蝶兰与白及进化关系较近，同源性较高。不同科植物中的 HSP17.3 氨基酸进化较保守，如大戟科的蓖麻和麻风树在同一分支上，豆科的大豆、树豆和蔓花生在同一分支上，茄科的辣椒、烟草和野生烟草在同一分支上，锦葵科的亚洲棉和陆地棉在同一分支上，

图4 不同植物 HSP17.3 蛋白的系统进化分析
Fig.4 Phylogenetic analysis of HSP17.3 protein from different plants species

2.3 *BsHsp17.3* 在不同组织中的表达分析

利用 Trizol 法分别提取白及的根、鳞茎、幼叶、花组织总 RNA，并反转录成 cDNA，以白及 28sRNA 为内参基因，通过半定量 RT-PCR 检测 *BsHsp17.3* 基因在不同组织中的表达情况。结果表明，*BsHsp17.3* 基因在白及幼叶和根中进行表达，在鳞茎和花不表达（图 5）。

2.4 *BsHsp17.3* 基因在逆境处理下的表达特征分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 *BsHsp17.3* 基因在逆境处理下的表达特征。结果表明（图6），在 0℃低温胁迫下，在处理 0.5 h 时，*BsHsp17.3* 基因相对表达量快速上升达到最高，随着处理时间延长相对表达量逐渐减少，到 12 h 时与对照非常接近。这说明 *BsHsp17.3* 基因能快速响应低温胁迫，诱导表达上调，但随着时间推移，基因的表达会被抑制，mRNA 被降解。在 35℃高温胁迫下，

BsHsp17.3 基因表达情况和低温胁迫较相似。在处理 0.5h 时，*BsHsp17.3* 基因相对表达量快速上升达到最高，随后信号逐渐减弱。*BsHsp17.3* 基因在 20%PEG 模拟干旱胁迫条件下相对表达量没有显著上升，且随干旱胁迫时间延长，该基因表达没有显著变化。上述研究表明，*BsHsp17.3* 基因在冷以及高温胁迫时表达量均会上调，该基因在植物防御冷及高温胁迫中发挥一定作用。

注：不同字母表示基因表达量在 P<0.05 水平上差异显著。
Note：Different letters indicate significant differences among relative expression level of genes at P<0.05.

图6 不同胁迫条件下白及叶片 *BsHsp17.3* 基因的相对表达水平

Fig.6 Relative expression analysis of *BsHsp17.3* in *B.striata* leaves under different stresses

3 讨论

大量研究表明，诱导型热激蛋白的累积决定着真核生物细胞的耐热性。热激条件下，生物体大部分正常蛋白的合成受到抑制，热激蛋白开始合成，合成的热激蛋白可保护机体蛋白质免遭损伤或修复已受损伤的蛋白质，从而对生物体起到保护作用（Ruibal et al，2013）。小分子□休克蛋白（sHSPs）单体都比较小，大小介于 15 ~ 42 kD 之间，核心区域是含有 100 个氨基酸左右的 α-晶体蛋白区域。大分子量的热休克蛋白是目前发现的最保守蛋白之一，它在亲缘关系较远的物种中也保持较高的同源性，可达 60% ~ 80%（Ruibal et al，2013；Chauhan et al，2012）。但是小分子热休克蛋白的保守性较低。在拟南芥中发现，sHSPs 家族（sHSP17、sHSP20、sHSP22）的同源性低于 50%（Ruan et al，2016；Murakami et al，2004）。同种类型的 sHSP 在不同物种中的同源性也较低，水稻中的 sHSP21 与拟南芥、烟草和大豆中的 sHSP21 同源性都低于 52%（Gustavsson et al，2002；Kaur et al，2015）。本实验也证实了这一结论，BsHsp17.3 与铁皮石斛 HSP17.3 蛋白具有较高的同源性，才达到 54%的相似性，与亚洲棉、蓖麻中的 HSP17.3 蛋白同源性都低于 50%。小分子□激蛋白蛋白家族 C 端 α-晶体蛋白称为热休克 ACD 区域，这一区域具有较高的保守性（Yang，2015；Sun et al，2012；Ruibal et al，2013）。ACD 区域含有两端序列，分别为 Pro-X（14）-Gly-Val-Leu 和 Pro-X（14）-X-Val/Leu，两端序列被亲水氨基酸片段隔开，白及 Hsp17.3 蛋白结构也证实了这一观点（Sun et al，2015；Ruibal et al，2013）。

sHSP 作为植物热激蛋白家族的重要一员，对于维持细胞内蛋白的正确构象，避免蛋白的聚集有重要作用。与大多数热激蛋白基因类似，sHSPs 不仅能响应热刺激，而且能响应低温、重金属、紫外辐射和高盐胁迫等（Sun et al，2001；Zou et al，2012；Sun，et al，2015）。将 35S CaMV 启动子驱动的番茄叶绿体小分子□激蛋白 cDNA 导入番茄表明，叶绿体小分子热激蛋白的过量表达提高了植物抗寒性（Wang et al，2005）。过量表达叶绿体 *HSP21* 基因也能增强拟南芥的强光和高温胁迫抗性（Zhang et al，2013，2014；Siddique et al，2008）。还有研究表明，小分子热激蛋白与植物细胞的减数分裂有关（Su et al，2013）。转 *OsHSP18.2* 基因的拟南芥种子能够通过减少 ROS 积累的毒害从而提高种子活力和寿命（Zhao et al，2014；Zhu，2016）。在核桃中瞬时过表达 *JrsHsp17.3* 能显著提高株系的 SOD、POD 等酶的活性，从而抵抗低温、高温和高盐胁迫

（Yang，2015）。从白及中分离的 *BsHsp17.3* 基因与其它小分子热激蛋白表达特性是一致的，能够快速响应高温胁迫，其诱导表达水平受到胁迫温度和时间的影响。胁迫温度越低或越高，基因表达响应越快，并且基因的表达不会随胁迫时间的延长而积累。在 PEG 模拟干旱胁迫下，*BsHsp17.3* 基因表达没有显著变化，可能是因为白及鳞茎中积累了大量的多糖，提高了细胞内的渗透压，阻止了细胞内水分的丧失，这也是 *BsHsp17.3* 基因在鳞茎中不表达的原因。

白及具有重要的药用价值。在高温和低温情况下，白及地上部分植株枯萎进行倒苗，这大大缩短了白及的生长周期，减缓了白及鳞茎的生长。对白及 *BsHsp17.3* 基因表达分析的研究有助于人工栽培白及温度条件的控制，缩短倒苗的时间，起到增产增收的经济效益。植物抗逆是一个复杂的综合反应机制，小分子热激蛋白蛋白参与了非生物胁迫的过程，在细胞内通过何种信号转导途径引起 *BsHsp17.3* 基因的表达，还有待进一步的研究。

参考文献:

BOUCHARD RA，1990. Characterization of expressed meiotic prophase repeat transcript clones of Lilium: Meiosis-specific expression , relatedness , and affinities to small heat shock proteingenes[J].Genome，33（1）：68−79.

CHAUHAN H，KHURANA N，NIJHAVAN A，et al，2012. The wheat chloroplastic small heat shock protein (sHSP26) is involved in seed maturation and germination and imparts tolerance to heat stress[J]. Plant Cell Environ，35（6）：1912-1931.

GUO M，LIU JH，LU JP，et al，2015.Genome-wide analysis of the CaHsp20 gene family in pepper: comprehensive sequence and expression profile analysis under heat stress[J]. Front Plant Sci，6：806.

GUSTAVSSON N，KOKKE BP，SILOW M，et al，2002. A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein[J].Plant J，29（5）：545-553.

KAUR H，PETLA BP，KAMBLE NU，et al，2015. Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress[J]. Front Plant Sci，6：713.

LI J，YANG H，ZHOU TH，2016.Microsatellite primer screening and population genetic diversity of *Bletilla striata*[J]. Acta Bot Bor-Occid Sin，36（7）：1343-1350.[黎君　杨恒　周天华.白及 SSR 引物筛选及群体遗传多样性研究[J].西北植物学报，2016，36（7）：1343-1350.]

MURAKAMI T，MATSUBA S，FUNATSUKI H，et al，2004. Over-expression of a small heat shock protein，sHSP17.7 confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants[J]. Mol Breed，13（2）：165-175.

PEGORARO C，MERTZ LM，MAIA LCD，2011. Importance of heat shock proteins in maize[J]. J Crop Sci Biotech，14（2）：85–95.

RUAN WJ，MEN WT，MA J，et al，2016.Cloning，Subcellular localization and expression analysis of heat shock protein gene *CpHSP70-1* from *Chimonanthus praecox*（L.）[J].J Southwest Agric Univ（Nat Sci Ed），38（1）：43-52.[阮文进，门维婷，马婧，眭顺照，2016. 蜡梅□激蛋白基因 CpHSP70-1 的克隆、亚细胞定位与表达分析[J].西南大学学报（自然科学版），38（1）：43-52.]

RUIBAL C，CASTRO A，CARBALLO V，et al，2013. Recovery from heat，salt and osmotic stress in Physcomitrella patens requires a functional small heat shock protein PpHsp16.4[J]. BMC Plant Biol，13（1）：1-18.

SARKAR NK，KIM YK，GROVER A，2009. Rice sHSP genes: genomic organization and expression profiling under stress and development[J].BMC Genomics，10（1）：393-410.

SU Q，RU ZG，QIN ZY，et al，2013. Differential expression of small heat shock protein gene （hsp23.5） between wheat （*Triticum aestivum*） BNS male sterile line and its conversion line[J]. J Agric Biotechnol，21（31）：29-37.［苏晴，茹振钢，秦志英，2013. 小□激蛋白基因（hsp23.5）在小麦 BNS 雄性不育系和转换系中的差异表达[J]. 农业生物技术学报,21（31）：29-37.]

SUN AQ，GE SJ，DONG W，2015. Cloning and function analysis of small heat shock protein gene *ZmHSP17.7* from maize[J].Acta Agron Sin，41（3）：414-421.[孙爱清，葛淑娟，董伟，2015.玉米小分子□激蛋白 *ZmHSP17.7* 基因的克隆与功能分析[J].作物学报，41（3）：414-421.]

SUN L，LIU Y，Kong X，et al，2012. ZmHSP16.9，a cytosolic class I small heat shock protein in maize (*Zea mays*)，confers heat tolerance in transgenic tobacco[J]. Plant Cell Reports，31（8）：1473-1484.

SUN W，VAN MONTAGU M，VERBRUGGEN N，2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. Biochim Biophys Acta，15（3）：1-9.

SUN W, BERNARD C, VERBRUGGEN N, et al, 2001. At-HSP17.6A encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression [J]. Plant J, 27（5）：407-415.

WANG L, ZHAO C M, WANG Y J, et al, 2005. Overexpression of chloroplast-localized small molecular heat-shock protein enhances chilling tolerance in tomato plant[J]. J Plant Physiol Mol Biol, 31（2）：167-174.

YANG GY, JIA CX, SUN YD, 2015. *JrsHSP17.3* Cloning from *Juglans regia* and its expression profiles in response to temperature stresses[J].Acta Botanica Boreal-Occidental Sin, 35（9）：1752-1756.[杨桂燕 贾彩霞 孙宇栋.核桃 *JrsHSP17.3* 基因克隆及温度胁迫响应模式分析[J].西北植物学报, 2015, 35（9）：1752-1756.]

YANG M, ZHANG Y, ZHANG H, et al, 2017. Identification of *MsHsp*20 gene family in malus sieversii and functional characterization of *MsHsp*16.9 in heat tolerance[J].Front Plant Sci, 8：1761.

ZHANG L, GAO YK, PAN HT, et al, 2013.Cloning and characterisation of a Primula heat shock protein gene, PfHSP17.1, which confers heat, salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis thaliana[J].Acta Physiologiae Plantarum, 35（11）：3191-3200.

ZHANG L, ZHANG Q, GAO Y, et al, 2014. Overexpression of heat shock protein gene *PfHS-P21.4* in *Arabidopsis thaliana* enhances heat tolerance[J]. Acta Physiol Plantarum, 36（6）： 1555-1564.

ZHAO YS, XIE SJ, LI XJ, et al, 2014. Repressor of silencing5 encodes a member of the small heat shock protein family and is required for DNA demethylation in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 26（6）：2660-2675.

ZHU LW, CAO DD, FU YY, 2016.Soluble oligosaccharide and small heat shock protein correlated with seed germination and vigor during hybrid rice seed maturation[J]. Acta Agron Sin, 42（5）：714-724.[朱丽伟 曹栋栋, 付玉营等.可溶性寡糖和小分子的热激蛋白与杂交水稻种子成熟过程中发芽能力及种子活力相关[J].作物学报, 2016, 42（5）：714-724.]

ZOU J, LIU C, LIU A, et al, 2012. Overexpression of *OsHsp*17.0 and *OsHsp*23.7 enhances drought and salt tolerance in rice[J]. J Plant Physiol, 169（9）：628–635.

SIDDIQUE M, GERNHARD S, VIERLING E, et al, 2008. The plant sHSP superfamily: Five new members in
Arabidopsis thaliana with unexpected properties[J]. Cell Stress Chaperones, 13（2）：183-197.